

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学 号: 200326054

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

维生素C两步发酵中关键酶山梨糖脱氢酶及其辅酶的研究

Study on Key Enzymes and Its confactor for Converting  
L-Sorbose to 2-Keto-Gulonic Acid in the Two-step  
Fermentation of Vitamin C

董 方

指导教师姓名: 王义权 教授

张惟材 副教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月 10 日

论文答辩日期: 2006 年 7 月 14 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 章晓波 \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2006 年 6 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。

本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明

确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：董方

2006年7月15日

# 厦门大学学位论文著作权使用声名

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（√） （请在以上相应括号内 打“√”）

作者签名：董方

日期：2006 年 7 月 15 日

导师签名：王义权

日期：2006 年 7 月 15 日

## 摘 要

在维生素 C 两步发酵工艺中, 第一步为醇糖转化, 即在葡萄糖杆菌作用下 D-山梨醇转化为 L-山梨糖; 第二步为糖酸转化, 在普通生酮基古龙酸菌 (*Ketogulonigenium vulgare*, 俗称小菌) 与其伴生菌 (俗称大菌) 组成的混合菌系的作用下 L-山梨糖转化为维生素 C 的前体 2-酮基-L-古龙酸 (KGA)。维生素 C 两步发酵实质上就是 D-山梨醇和 L-山梨糖的专一性生物氧化过程。阐明这一系列生物氧化过程的生化反应机制对于指导维生素 C 的遗传育种甚至通过代谢工程构建由山梨醇到 KGA 的一步发酵工程菌, 都具有重要意义。

本课题组已从小菌细胞裂解物中分离得到了催化山梨糖生物氧化的一种关键酶——山梨糖脱氢酶 (SDH), 该酶能够将 L-山梨糖直接转化为 KGA; 同时构建了小菌的基因文库, 并以 SDH 的抗体筛选文库, 分离得到编码 SDH 的基因 (*sdh*)。

本文在上述工作基础上, 首先在大肠杆菌中对山梨糖脱氢酶进行了高效表达, 对表达产物进行了纯化, 研究了该酶的最适反应温度、最适反应 pH 值、酶稳定性、米氏反应常数、酶的激活剂和抑制剂、金属离子的激活与抑制作用等重要性质。

研究葡萄糖杆菌对山梨糖脱氢酶的影响。以氨甲酰化酶基因 (*hyuC*) 为报告基因, 构建了山梨糖脱氢酶-氨甲酰化酶融合表达载体, 在大肠杆菌中可以同时检测到山梨糖脱氢酶和氨甲酰化酶活性; 而在葡萄糖杆菌中, 只能检测到氨甲酰化酶活性, 未检测到山梨糖脱氢酶活性。质粒稳定性实验和质粒回转实验说明该质粒在葡萄糖杆菌中稳定存在。由于 *hyuC* 基因位于 *sdh* 基因下游, 融合基因的转录和翻译是从山梨糖脱氢酶到氨甲酰化酶, 氨甲酰化酶在葡萄糖杆菌中表达说明包含山梨糖脱氢酶在内的融合蛋白能够在葡萄糖杆菌中转录并翻译, 山梨糖脱氢酶可能被宿主的酶系降解失活。

通过体外实验也证实葡萄糖杆菌裂解物对山梨糖脱氢酶具有降解作用。将山梨糖脱氢酶与葡萄糖杆菌裂解液保温过夜后, 通过 SDS-PAGE 检测到电泳图谱上约 60kD 和 49kD 处出现两条明显条带, 对这两条带进行蛋白质 N-端序列分析, 结果显示其 N 端的前 3 个氨基酸残基均为谷氨酰胺-苏氨酸-丙氨酸, 推测 49kD 的

蛋白条带是由 60kD 山梨糖脱氢酶蛋白 C-端降解产生。对预测的 *sdh* 读框 N-端蛋氨酸至谷氨酰胺之间 23 肽氨基酸序列分析,发现 23 个氨基酸中大部分氨基酸为疏水氨基酸,并与醇脱氢酶的信号肽序列有 38%的同源性,推测山梨糖脱氢酶 N-端的 23 肽可能是一段信号肽,与该酶在细胞膜上的定位相关。

吡咯喹啉醌, 又称吡咯并喹啉苯醌, 英文名: pyrroloquinoline quinone, 缩写为 PQQ, 另名为 Methoxatin, 化学名为, 4,5-二氢-4,5-二氢化-1-氢吡咯 (2,3f) 醌-2,7,9-三羧酸, 是一种新发现的多种氧化还原酶的辅基, 不同于已知的辅酶或辅基 (NAD、NADP、FMN、FAD、辅酶 A、辅酶 Q), 目前被认为是一种新的 B 族维生素, 具有一定的医药应用前景。PQQ 的生理学功能主要表现在: 刺激某些植物发育及微生物和人体细胞生长, 作为动物体生长发育的必需因子, 清除自由基保护机体免受自由基损害, 防治肝损伤; 促进神经生长因子合成等。在细菌中 PQQ 一般是由一组排列成簇的相关基因控制合成的, 根据不同来源 PQQ 基因的同源性和对应关系可将 PQQ 基因归为 7 类, 即 *pqqA*、B、C、D、E、F、G。不同细菌合成 PQQ 所需基因数目不等。本文通过从土壤中筛选得到了两株 PQQ 高产菌株, 产量达到 60 $\mu$ g/ml。并对该两种菌株进行了 16S-RNA 鉴定。

关键词: 普通生酮基古龙酸菌; 山梨糖脱氢酶; 葡糖杆菌; 吡咯喹啉醌

## ABSTRACT

In the two-step fermentation of vitamin C, the first step is the conversion of D-sorbitol into L-sorbose by *Acetobacter melanogenum*, and the second step is the conversion of L-sorbose into 2-Keto-L-gulonic acid (KGA) by *ketogulonigenum vulgare*. The so-called two-step fermentation of vitamin C is virtually the bio-oxidation of D-sorbitol and L-sorbose. The elucidation of the biochemistry process is important to the production of vitamin C and design of the engineered bacteria, in which the related genes from *Acetobacter melanogenum* and *ketogulonigenum vulgare* were introduced, by using the recombinant DNA technology.

In the former work, we have purified an enzyme from *ketogulonigenum vulgare*, which is able to transform L-sorbose directly to KGA. We have also constructed the genomic library of the *ketogulonigenum vulgare*, from which the genes including the *sdh* gene were isolated.

On the base of the work above, the SDH were highly expressed and purified, its optimal temperature and pH, the stability of the enzyme and some other important properties have been studied. The dynamic studies demonstrate that it is a typical Michslis-Menten enzyme. We also study the activator and inhibitor of SDH.

We study the effect of *Acetobacter melanogenum* to SDH. Constructing the SDH-HyuC difussion expression vector, the *hyuC* gene as a report gene. In *E.coli*, we can detect the SDH and HyuC activity at the same time. But in *Acetobacter melanogenum*, we can only detect the HyuC activity. The plasmid is stability in the *Acetobacter melanogenum*. Because the *hyuC* gene on the backward position of the SDH gene, the transcription and translation order of the diffusion gene is from *sdh* to *hyuC*, the expression of *hyuC* gene explain that the diffusion protein can be

transcribed and translated in the *Acetobacter melanogenum*, the SDH may be degraded in the host bacterium.

The vitro experiment prove this fact too. We speculate that the C-terminal degradation of SDH , through the analyzing of SDH open reading frame ,we find that on the amino acid sequence ,the Met to Gln there are 23 amino acid, these amino acid are most hydrophobe, may be a signal peptide ,which orientate the SDH.

PQQ is the third cofactor of redox-enzyme of Gram-negative bacteria. It is considered a new vitamin B and widely used in pharmaceutical industry and agricultural production. In recent years, some studies about the biological function of PQQ have been reported. A screening method that allows available, efficient, and reliable detection and selection of high lever pqq prdouctivity micro-organisms was devised. We finaly get two strains from soil samples which PQQ can reach 60μg/ml.

Key words: *Ketogulonigenium vulgare*; L-Sorbose dehydrogenase(SDH); *Acetobacter melanogenum*; pyrroloquinoline quinone

## 前 言

维生素 C (Vc) 又名 L-抗坏血酸, 是一种人体必需维生素, 在医药、食品、饲料、化妆品等领域应用广泛。两步发酵工艺是我国独创的维生素 C 生产工艺, 曾居世界领先水平。我国现有的 Vc 生产规模占世界总生产规模的 1/3~1/2, 是我国医药领域的一项支柱产业。该工艺包括两个发酵步骤, 第一步是在醋酸菌(如生黑醋杆菌或氧化葡萄糖酸杆菌等)的作用下 D-山梨醇氧化为 L-山梨糖(醇糖转化), 在莱氏法中已得到广泛应用, 其转化机制和相关基因目前国外也已经研究得很清楚。第二步微生物发酵法是中国科学家在 20 世纪 70 年代建立起来的, 是在一种混合菌系的作用下将 L-山梨糖进一步氧化为 Vc 的重要中间体 2-酮基-L-古龙酸(俗称糖酸转化)。上述混合菌系包括两种微生物, 直接负责山梨糖生物氧化的微生物俗称小菌, 最初曾被鉴定为氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*), 最近 Urbance 等经系统分类学研究对其分类位置重新作了确定, 该菌被更名为普通生酮基古龙酸菌 (*Ketogulonigenium vulgare*)。另一种微生物俗称大菌, 本身不能转化山梨糖, 作为伴生菌起到辅助小菌生长和产酸的作用。许多微生物具有这种伴生菌的作用, 生产中多用芽孢杆菌。

### 1 维生素 C 合成国内外研究进展

1933 年德国化学家莱氏 (Reichstein) 首先以葡萄糖为原料人工合成维生素 C 获得成功, 国外至今几十年来仍采用此法。莱氏法是以葡萄糖为原料, 经催化加氢制取 D-山梨醇, 然后经醋酸菌发酵生成 L-山梨糖, 再经酮化和化学氧化、水解后得到双丙酮-2-酮基-L-古龙酸、2-酮基-L-古龙酸, 最后经盐酸转化成维生素 C。Vc 的莱氏合成路线见图。尽管一分子的葡萄糖应该被转化为一分子的 Vc, 但即使随着近年来化学工艺的改进, “莱氏法”合成 Vc 的实际转化率大约为 50%。

自二十世纪60年代以来, 各国科学家对“莱氏法”的改进做了大量工作, 试图简化或以生物氧化法替代以化学合成为主的“莱氏法”, 目前已取得了许多重要成果。如“艾杜糖酸转化法”、“L-古龙酸转化法”、“山梨醇直接发酵法”、“葡萄糖直接发酵法”、“山梨酮转化法”等, 从利用生物转化生产逐步向完全生物转化发展。能够合成Vc或其中间代谢产物的微生物种类繁多, 其中以细菌转化法研究最多。已经有关于几种细菌发酵生产2-KGA的报道。微生物通常不能直接合成Vc, 而是合成Vc重要前体2-酮基-L-古龙酸 (2-KGA)。在目前研究生产Vc的



方法中，除了日本研究多年的“葡萄糖直接发酵法”有其实际意义值得进一步探讨、我国研究的“二步发酵法”已用于工业生产外，其它各国的研究都因收率不高，至今仍停留在实验水平。

### 1.1 从葡萄糖一步发酵生产维生素 C 的前体 2-酮基-L-古龙酸 (2-KGA)

以葡萄糖作底物生产 2-KGA 的途径，先由欧文氏菌 (*Erwinia sp.*) 转化葡萄糖生成中间产物 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸 (2,5-DKG)，再经棒杆菌 (*Corynebacterium sp.*) 最终转化为 2-酮基-L-古龙酸 (2-KGA)，称为“葡萄糖串联发酵法”(图 1.1)。研究发现葡萄糖在单个微生物内是经过细胞膜上一系列的不依赖 NAD (P) 的脱氢酶催化，经过 D-葡萄糖酸 (简称 GA) 和 2-酮基-D-葡萄糖酸最后才氧化为 2,5-DKG，发酵液经 SDS 处理后直接被一株突变的棒杆菌再发酵生成 2-KGA，在 10 L 的罐上总转化率可达 84.6%<sup>[1]</sup>。但是该方法周期较长，而且中间产物 2,5-DKG 不稳定，尤其对热和碱液<sup>[2]</sup>。用 SDS 处理降低菌数时要损失 1.5% 的 2,5-DKG，同时使生产周期进一步延长，工艺繁琐，降低了最终收率。该生产方法与生产时间还有一定距离。

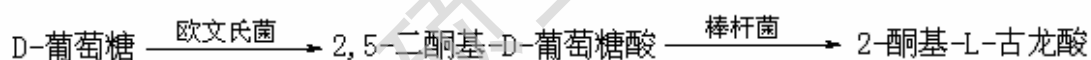


图 1.1 葡萄糖“串联发酵法”合成 2-KGA 反应途径

80 年代后期，研究工作者采用重组 DNA 技术，在“葡萄糖串联发酵”途径基础上构建相应的代谢工程菌，实现利用葡萄糖一步发酵直接产生 2-KGA(图 1.2)。

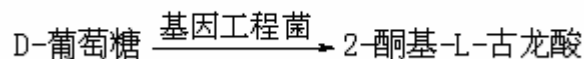


图 1.2 葡萄糖“一步发酵法”合成 2-KGA 反应途径

在证实了棒杆菌中 2,5-DKG 的转化还原机制后，1985 年 Anderson<sup>[3]</sup>等人纯化和鉴定了棒杆菌 ATCC31090 中 2,5-DKG 还原酶 I，分析了该酶 N-末端的 40 个氨基酸顺序，人工合成兼并探针，用原位杂交法从部分基因文库中筛选出了不完全的一个基因片段。然后，他们用已知片段为探针克隆到完整的基因，插入能在大肠杆菌中有效作用的 Trp 启动子和人工合成的核糖体结合位点 (RBS)，使

之在前一步发酵产生茵草生欧文氏菌 (*E.herbicola* ATCC21998) 中有效表达, 该法在 1 L 自控发酵罐中生成 2-KGA 的收率可达 33.3%, 但由于基质浓度低, 仅获得 1 g/L 的

产物<sup>[4]</sup>。1987 年, Hardy 等用类似方法从另一株棒杆菌 SHS 752001 中纯化得到 2,5-DKG 还原酶 II, 进行氨基酸测序并合成探针, 一次性从基因组中克隆了另一个 2,5-DKG 还原酶基因, 用 P1 启动子表达在柠檬欧文氏菌 (*E.citrus* SHS2003) 中, 1 L 罐发酵转化率为 49.4%, 72 h 发酵可获得 20 g/L 的 2-KGA<sup>[5]</sup>。对于该途径我国学者也进行了大量的研究工作<sup>[6-8]</sup>, 尹光琳等人筛选诱变得到欧文氏菌 SCB125 和棒杆菌 SCB3058, 取得了从葡萄糖串联发酵生成 2-KGA 的成功, 在此基础上, 采用 PCR 技术, 从棒杆菌 SCB3058 克隆到两个 2,5-DKG 还原酶基因, 其序列与前面报道的基本一致, 但略有突变, 其中 2,5-DKG 还原酶 I 在 P1 启动子和  $CI_{857m}$  蛋白控制下, 通过提高温度诱导在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和欧文氏菌 SCB125 中表达的酶比活力相当高。2,5-DKG 还原酶 II 基因在 T7 启动子控制下也在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功地高表达, 表达的酶比活更高。

利用构建的基因工程菌从葡萄糖直接发酵生成 2-KGA, 工艺虽然简单, 但是目前的转化率还不能另人满意。

从葡萄糖直接一步发酵生产 Vc 前体 2-KGA 取得了很大进展, 但目前的水平离工业大规模生产还有较大的差距。

## 1.2 由山梨醇直接转化 2-KGA

D-山梨醇由 D-葡萄糖高压加氢合成, 可直接发酵 D-山梨醇生成 2-酮基-L-古龙酸。能完成该转化的菌株有醋酸杆菌 (*Acetobacter* sp.)、葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter* sp.)、假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.) 等<sup>[9-11]</sup>, 它们也可作为 Vc 二步发酵的第一步菌。1975 年 Makover 等对生黑葡萄糖酸杆菌 (*G. melanogenus*) 和恶臭假单胞菌 (*P. putide*) 的研究表明, 该步转化遵循 “L-山梨酮途径”<sup>[12]</sup>, 经过许多学者多年探索, 该途径已经研究得比较清楚, 见图 1.3。

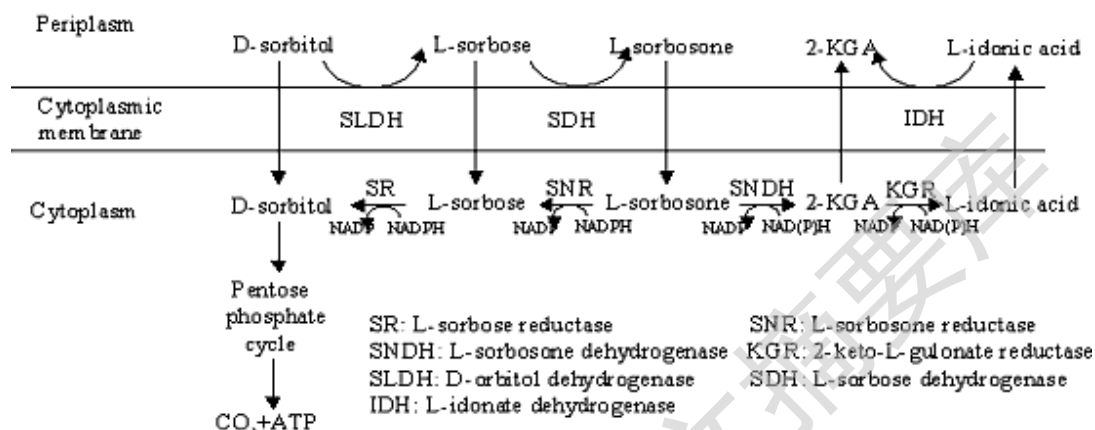


图 1.3 葡萄糖杆菌“山梨酮途径”代谢图

在葡萄糖杆菌中负责糖酸转化的脱氢酶主要有两种，L-山梨糖脱氢酶(SDH)可催化 L-山梨糖转化为 L-山梨酮，后者在 L-山梨酮脱氢酶（SNDH）作用下进一步氧化为 2-酮基-L-古龙酸。1991 年 Shinagawa 等<sup>[13]</sup>从生黑葡萄糖酸杆菌（*G.melanogenus*）的突变株 UV40 中分离纯化了膜结合的 L-山梨糖脱氢酶。该酶由 4 个分子量为 58kD 的相同亚基组成，属黄素蛋白酶，对 L-山梨糖有很高专一性。Hoshino 等分离纯化了 L-山梨酮脱氢酶，该酶主要存在于胞浆中，由 4 个分子量为 50kD 的相同亚基组成，以 NAD(P)为电子受体<sup>[14,15]</sup>。Shinjoh 等将醋杆菌膜结合的山梨酮脱氢酶克隆入氧化葡萄糖杆菌，使两步转化在氧化葡萄糖杆菌中完成。但是构建的工程菌发酵 2-KGA 的产量较野生型的生黑葡萄糖酸杆菌（*G.melanogenus*）UV10 并没有较大的提高<sup>[16,17]</sup>。

葡萄糖酸氧化杆菌(*G. oxydaus*)T-100 在含有质量分数为 5%D-山梨醇发酵培养基中进行转化，仅仅获得 2-KGA 7 g/L；经过诱变技术企图获得转化能力高的突变株，但未成功，诱变结果转化率低于 13%。1997 年 Saito 等分离了氧化葡萄糖杆菌 T-100 中的山梨糖脱氢酶及山梨酮脱氢酶，经 SDS-PAGE 电泳转膜，测定氨基酸序列。根据测定结果设计兼并引物作探针，从葡萄糖酸氧化杆菌(*G. oxydaus*)T-100 基因组文库中筛选相关基因。选取一株阳性克隆，以 EcoR I 和 Sal I 酶切，回收大约 6 kb 片段，克隆入 pUC19 中。分析测序结果表明：长 4 624 bp

的基因片段编码 2 个阅读框架，而且有所重叠。两个基因组成一个操纵子，第一个基因编码由 498 个氨基酸组成的山梨酮脱氢酶，第二个基因编码由 531 个氨基酸组成的山梨糖脱氢酶，基因结构见图 1.4。

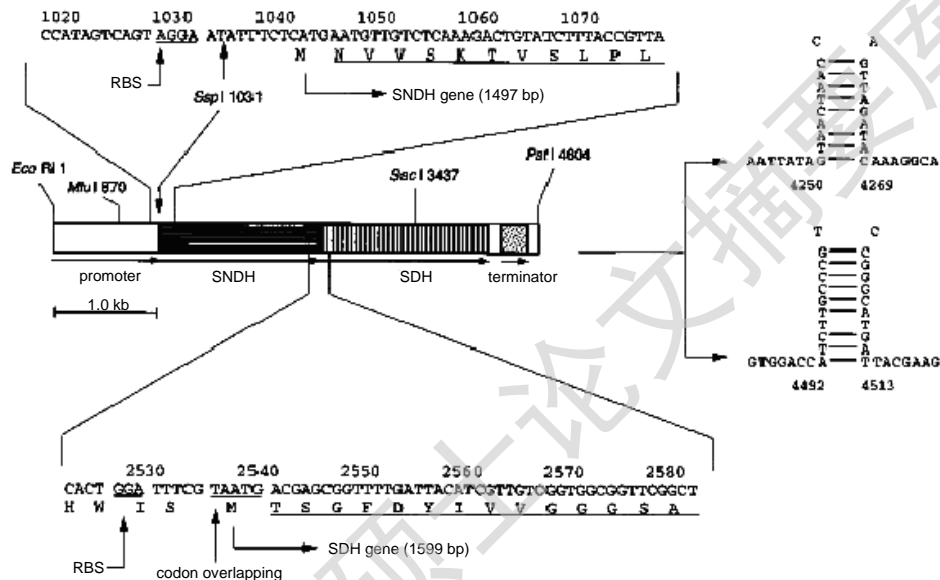


图 1.4 山梨糖脱氢酶和山梨酮脱氢酶基因结构示意图

下划线是指与纯化酶氨基酸序列分析一致的氨基-末端序列。RBS，核糖体结合序列；terminator，形成茎-环结构的可能转录终止序列。

葡萄糖酸氧化杆菌 *G*<sub>624</sub> 发酵时能耐受高浓度的 D-山梨醇，并能将含有 20% 山梨醇的培养基在温度 30℃ 下，发酵 10 h 时定量地转化成 L-山梨糖。但是该菌存在 2-KGA 还原酶活性，可将终产物 2-KGA 还原为 L-艾杜糖酸。将 2-KGA 还原酶基因发生突变，阻断了 L-艾杜糖酸途径。Saito 等构建含山梨糖脱氢酶基因的穿梭载体 pSDH155，转化至 L-山梨糖脱氢酶突变株 *Goxydans G624* 中，其 Vc 前体 2-KGA 产量提高到 *Goxydans T-100* 的 230%。宿主菌的化学突变抑制 L-艾杜糖途径和用大肠杆菌 *tufB* 启动子替换原始启动子导致了 2-KGA 产量的提高。通过重组菌株 *Gluconobacter* 的简单发酵取得了从 D-山梨醇到高水平的 2-KGA，重组葡萄糖酸氧化杆菌合成 2-KGA 途径见图 1.5。

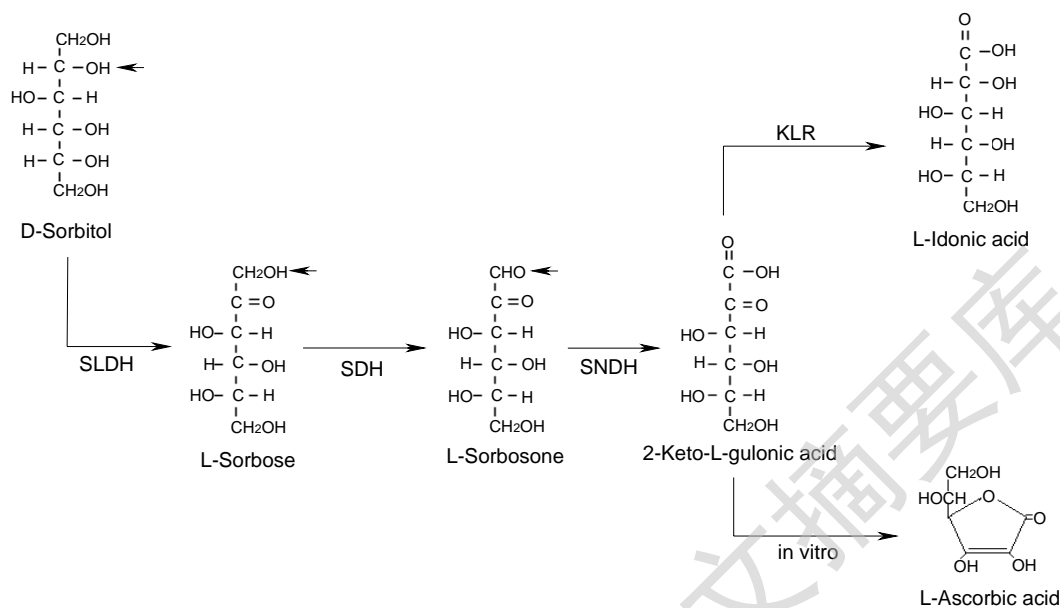


图 1.5 重组氧化葡萄糖杆菌的 2-KGA 生物合成途径

SLDH, D-山梨醇脱氢酶; KLR, 2-KGA 还原酶。

由 D-山梨醇发酵直接生成 2-KGA 转化效率通常不超过 10%，葡萄糖酸氧化杆菌中的山梨糖脱氢酶基因与我们从小菌中分离得到的山梨糖脱氢酶基因也有很大差别。国内曾于六、七十年代开展过此方面的工作，终因转化效率太低而放弃。

### 1.3 由山梨醇二步发酵转化 2-KGA

1970 年中国科学院微生物研究所和北京制药厂合作，筛选到能利用 L-山梨糖产生 2-KGA 的优良混合菌株 N1197A，这奠定了我国特有的“二步发酵法”第二步混合菌发酵的基础<sup>[18,19]</sup>。他们从 5327 株细菌中筛选到 1645 株可利用 L-山梨糖的细菌，经过多次纸层析分析筛选，得到 3 株能利用 L-山梨糖产生 2-KGA 且产酸量在 1 mg/mL 以上的菌株。其中 N1197A 产酸量最高。纸层析分析结果其发酵产物单一，摇瓶发酵产量可达 10 mg/mL。进一步研究表明，参与此过程的是两种菌，而且只有两种菌在一起混合培养才能正常产酸。经过菌种鉴定，一种为假单孢菌 (*Pseudomonas striata*)，俗称大菌，不能产酸，但能为另一种菌的生长传代提供条件。另一种为氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*)，可以产酸但单独不能传代生长。在此后的数年里，我国的科研工作者做了大量的研究实践工作，为“二步发酵法”这一工艺在生产实践中的应用做出了卓越贡献。自

1976 年 6 月通过中试鉴定后,已逐渐在全国范围内推广使用。邵军<sup>[20]</sup>和魏东芝<sup>[21]</sup>等进行了第二步发酵过程动力学研究,测定了大小菌的生长周期及发酵过程中产物和生成物浓度的变化,建立了简化的动力学模型,为发酵工艺的研究奠定了基础。东北制药总厂和北京医药工业研究院协作研究,采用在发酵体系中加入抑制剂的方法,在 30 L 的自控罐中发酵,连续 5 批转化率超过 82%。通过控制混合培养时两种菌的比例及 L-山梨糖初始浓度等方法对发酵条件进一步优化,L-山梨糖转化成 2-KGA 的转化率可达 97%,这项成果达到世界上最先进水平<sup>[22]</sup>。

“二步发酵法”在中国、日本、欧洲和美国申请了专利,并于八十年代中期向瑞士 Hoffmann-La-roche 制药公司进行了技术转让。“二步发酵法”工艺路线如图 1.6:

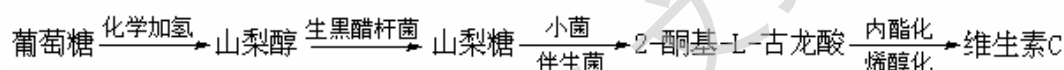


图 1.6Vc “二步发酵法”工艺路线图

与以化学合成为主的“莱氏法”相比,“二步发酵法”采用混菌发酵代替化学转化 L-山梨糖生成 2-KGA,从而简化了工艺,减少了生产设备,降低了成本,革除了大量有机溶媒和次氯酸钠等有毒物品的使用,并大大减少了“三废”的排放。但是,“二步发酵法”也存在着一定的问题。生产工艺涉及两步发酵、三种菌株,对于 50~100 吨的大罐需二级或三级制种,200 吨以上的罐需四级制种,因而工艺流程长,操作繁琐,易于污染。第二步混菌发酵,由于小菌单独生长和传代困难,在生产中需要注意与大菌的搭配比例,这增加了制种工艺的难度,而且也为菌种保藏提出了严格要求,同时也造成了产酸不稳定。另外,近年来国外 Vc 发酵技术发展很快,其中葡萄糖一步发酵工艺和山梨醇直接发酵工艺对我国“二步发酵法”日益构成威胁,Vc 发酵技术的革新迫在眉睫。

利用基因工程手段,将与 Vc 发酵生物转化相关的基因整合到同一株微生物中,构建成一步发酵工程菌,既可充分利用“二步发酵法”的优势,又可简化工艺,减少浪费,全面提高我国 Vc 生产的竞争力,继续保持世界领先水平。在筛选到第一步发酵抗噬菌体的菌株后,第一步发酵的转化效率已高达 97.5%,技术十分成熟。目前国内的研究主要集中在第二步发酵上。尹光琳等证实在第二步混菌发酵过程中有 L-山梨酮出现,当 L-山梨酮积累至一定量时便不再增加,此时 2-KGA

开始大量产生。他们根据文献报道的“山梨酮还原酶”基因序列设计 PCR 引物，以具有高活力 L-山梨酮脱氢酶的菌种 *Acetobacter liquefaciens* IFO12258 基因组为模板，扩增了 L-山梨酮脱氢酶基因。构建成功原核表达质粒以后，实现了在大肠杆菌中的高效表达，并显示了较高的酶活性<sup>[23]</sup>。但是，将目前收集到的少数 L-山梨糖脱氢酶基因进行同源性比较分析后发现相互间同源性很小，而且并未能根据已知序列从小菌基因组中分离到该基因。1999 年刘娟和尹光琳用质粒 pKS 作载体构建了小菌的基因文库<sup>[24]</sup>，由于使用质粒作为载体，容量相对较小（5~10kb）为使文库的覆盖率达到 99.99%需要的重组子相应就要增多，最终增大文库筛选的难度和工作量。中国科学院沈阳应用生态研究所的科研人员从终产物降解的角度出发对古龙酸还原酶（KGR）进行研究。1992 年郭振勇<sup>[25]</sup>和蒋宇扬<sup>[26]</sup>等对小菌中古龙酸还原酶的理化及酶学性质进行了研究。认为由于该酶的存在而使 2-KGA 的产量至少降低 3~5%。赵巍纯化了该酶，并对其 N 末端测序。Genebank 检索，发现它在肽段序列上是全新的。利用 KGR 肽段序列合成兼并寡核苷酸进行杂交筛选，得到了古龙酸还原酶基因片段并进行了克隆和测序<sup>[27]</sup>。

我国的“二步发酵法”是唯一应用于大规模生产实践的微生物转化法，具有糖酸转化效率高的突出优势。目前利用生物技术方法构建一步发酵工程菌的研究还极为有限。我们应当充分利用我国特有的资源在目前的工作基础上积极开展这方面的工作。第二步混合菌发酵由山梨糖转化为 2-KGA 的机制不清一直是研究工作的主要限制因素。长期以来，人们将小菌鉴定为氧化葡萄糖杆菌，但从其生理生化反应特性及最终代谢产物上看与典型的氧化葡萄糖杆菌有所差别。最近 Urbance 等经系统分类学研究对其分类位置重新作了确定。该菌被命名为普通生酮基古龙酸菌（*Ketogulonigenium vulgare*）。这样 L-山梨糖代谢转化为 2-KGA 的代谢途径可能不同于氧化葡萄糖杆菌中的 L-山梨酮途径，其机制还应进一步深入研究。薛震役和尹光琳对小菌山梨糖脱氢酶进行了分离纯化。罗氏公司日本研究中心的 Akira Asakura 和 Tatsuo Hoshino 用类似的方法纯化了关键酶，并对其酶学性质进行研究。他们认为该酶是一种以吡咯喹啉醌（PQQ）为辅酶的醌蛋白，其活性形式为由一个大小为 64.5KD 和一个 62.5KD 的亚基组成，其底物专一性较为广泛，可催化多种醇或醛类化合物脱氢，山梨醇和山梨糖均可作为该酶的底物，这一种酶可催化完成由山梨糖到 2-KGA 的转化。

我们研究了 *Ketogulonigenium vulgare* 转化山梨糖产生 KGA 的机制，确定中国二步发酵工艺中山梨糖的代谢不同于国外业已阐明的山梨酮途径，糖酸转化主要是由一种脱氢酶（山梨糖脱氢酶 SDH）催化完成的。我们对该酶进行了分离纯化，离体实验结果表明该酶能够将 L-山梨糖转化为 2-KGA。以纯化的酶蛋白免疫家兔，制备了多克隆抗体，效价在 6400 以上。利用粘粒载体 pKC505 构建了 *Ketogulonigenium vulgare* 基因组文库，采用 Dot-ELISA 方法用制备的多克隆抗体筛选文库，筛选得到 1 个阳性克隆。经过亚克隆获得包含山梨糖脱氢酶基因的长为 5325bp 的片段。对测序结果进行分析表明：该片段编码 1 个完整的开放阅读框（ORF），起始于第 2262 位的 GTG，终止于 4101 位的 TAA，全长 1839bp，编码 612 个氨基酸。序列分析和同源检索表明，该基因是不同与国内外任何报道的新基因，BLAST 检索发现与该基因编码产物同源性最高的蛋白是 *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* 的乙醇脱氢酶，两者同源性为 46%。该山梨糖脱氢酶基因序列已经申请专利<sup>[28]</sup>。将山梨糖脱氢酶基因转化入第一步菌中，可能简化维生素 C 生产工艺，有一定的应用前景。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库